MycAssay™ Aspergillus
Cepheid SmartCycler®
Échantillons Respiratoires
REF 080-045

Usage prévu

L'utilisation de MycAssay™ Aspergillus, réservée au personnel de laboratoire qualifié, est indiquée pour la détection qualitative d'ADN génomique d'*Aspergillus* spp. extrait d'échantillons respiratoires des voies respiratoires inférieures (par exemple, échantillons bronchiques) comme aide au diagnostic chez les patients adultes suspects d'infection ou d'allergie à *Aspergillus*.

Le test MycAssay™ Aspergillus a été validé pour une utilisation sur l'automate Cepheid SmartCycler®, avec le logiciel Dx versions 1.7b et 3.0.

Résumé et explication

Aspergillus spp. est une moisissure opportuniste ubiquiste qui provoque des syndromes à la fois allergiques et invasifs. Ce genre se décline en 300 espèces environ, parmi lesquelles 41 sont associées à des maladies chez l'homme. La majorité des infections sont provoquées par *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* et *A. niger*. Moins couramment, *A. nidulans* et d'autres espèces rares telles qu'*A. sydowii, A. versicolor, A. lentulus et A. pseudofischeri* sont impliquées [1]. La plupart des infections et des allergies dues à *Aspergillus* spp. affectent les voies respiratoires. Les syndromes allergiques incluent notamment l'aspergillose bronchopulmonaire allergique et la sinusite aspergillaire allergique, généralement dues à *A. fumigatus*. Les aspergilloses pulmonaires chroniques comprennent l'aspergillome, l'aspergillose pulmonaire cavitaire chronique et l'aspergillose fibrosante chronique. L'aspergillose invasive apparaît chez les groupes de patients à risque, notamment ceux traités par corticoïdes et ceux atteints de neutropénie ou de dysfonctionnement du système phagocytaire (c'est-à-dire granulomatose chronique ou infection à VIH). Environ 80 % des cas d'aspergillose invasive touchent les poumons [2].

Le diagnostic général de l'aspergillose pulmonaire invasive inclut un examen de tomodensitométrie (TDM), une bronchoscopie et un lavage broncho-alvéolaire (observation sous microscopie et culture), une recherche de l'antigène d'*Aspergillus* dans le sang ou un examen histologique d'échantillons prélevés par biopsie. Dans ce cas de figure, les cultures sont souvent faussement négatives [3]. En effet, le lavage broncho-alvéolaire donne un résultat positif par culture dans environ 40 % des cas seulement, même lorsque le diagnostic a été confirmé par d'autre moyens [4,5,6,7], ce qui traduit le manque de sensibilité de la culture pour la détection de l'aspergillose invasive et de l'aspergillose pulmonaire chronique. Néanmoins, les cultures sont importantes lorsqu'elles sont positives car la plupart des tests de diagnostic n'indique ni le genre, ni l'espèce du champignon responsable de la maladie ni le profil de sensibilité de l'isolat qui entraîne l'infection.

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique complique l'asthme et la mucoviscidose [8] et apparaît rarement sans affection sous-jacente. La plupart des cas sont associés à l'*A. fumigatus*. Occasionnellement, d'autres champignons sont impliqués. Cette maladie est caractérisée par un encombrement épisodique des voies aériennes par d'épais bouchons d'expectorations contenant de nombreuses hyphes d'*Aspergillus*, un taux d'IgE totales sériques > 1 000 IU/mL et des anticorps IgE et IgG détectables spécifiques d'*A. fumigatus* ou un test positif de la piqûre épidermique par *Aspergillus*. Les cultures d'expectorations peuvent être positives pour *A. fumigatus* et la bronchectasie est visible sur un tomodensitogramme de la poitrine.

[1] Base de données des espèces sur www.aspergillus.org.uk
[2] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Medical Mycology: 43 (suppl. 1): S207-38.
[3] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infectious Diseases: 9: 609-22.
[4] Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med: 86: 243-8.
[5] Greub G and Bille J. (1998) Aspergillus species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to deteremine significance. Clin Microbiol Infect 4: 710-716.
[6] Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L,Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases; 33:1824–33.
[7] Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients The Journal of Infectious Diseases. 186:1297–306.
[8] Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy: 60: 1004-13.

Les méthodes actuelles de diagnostic de l'aspergillose pulmonaire chronique font appel à la fois à la radiologie (qui n'est pas spécifique) [9] et à la sérologie (anticorps IgG d'*Aspergillus* ou précipitines) qui se révèle positive avec la plupart des formes d'aspergillose (et qui n'est donc pas spécifique d'une manifestation particulière d'aspergillose) [1]. Les cultures donnent des résultats positifs dans seulement 40 à 65 % des cas confirmés par radiologie ou sérologie [10,11]. Dans la mesure où le diagnostic différentiel est vaste et inclut notamment la tuberculose, les mycobactérioses atypiques, la sarcoïdose, l'histoplasmose, la coccidioïdomycose, la pneumoconiose, le poumon rhumatoïde, la pelvispondylite rhumatismale et d'autres, il est important d'établir la présence d'*Aspergillus* spp. dans les échantillons respiratoires afin d'éviter tout retard de diagnostic de l'aspergillose et les traitements inadaptés.

MycAssay™ Aspergillus est un kit de diagnostic moléculaire qui repose sur la détection de l'ADN génomique d'*Aspergillus* spp. par la technologie de la PCR en temps réel à balises moléculaires [12]. Le mode opératoire complet, extraction d'ADN de l'échantillon clinique comprise, peut être réalisé en 4 heures alors que la méthode par culture peut prendre plusieurs jours pour produire des résultats positifs. Ce test présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes de diagnostic actuelles de l'aspergillose invasive aiguë et de l'aspergillose pulmonaire chronique, notamment une détection plus rapide d'*Aspergillus* spp. et une augmentation potentielle de la sensibilité à *Aspergillus spp.* chez les patients fortement immunodéprimés suspects d'aspergillose pulmonaire invasive.

Principes de la méthode

Après mélange des réactifs du kit MycAssay™ Aspergillus avec un échantillon contenant la séquence cible d'ADN d'*Aspergillus* (une partie du gène ribosomal 18S d'*Aspergillus*), un cycle thermique entraîne l'amplification de l'ADN. Le test utilise également un contrôle interne d'amplification (IAC pour Internal Amplification Control), un fragment d'ADN non présent dans le génome des Aspergillus, d'autres champignons, des bactéries ni de l'homme, pour détecter les substances inhibitrices de la PCR et confirmer la fonctionnalité des réactifs.

Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées par des balises moléculaires. Il s'agit de sondes d'hybridation oligonucléotidiques monobrins qui forment une structure tige-boucle. La boucle contient une séquence de la sonde complémentaire à la séquence de la cible, tandis que la tige est formée par annelage de séquences latérales complémentaires de part et d'autre de la séquence de la sonde. Un fluorophore, qui émet de la fluorescence lorsqu'il est excité par une lumière de longueur d'onde adaptée, est fixé par liaison covalente à une extrémité d'un bras et un extincteur de fluorescence, qui inhibe la fluorescence du fluorophore lorsqu'il en est physiquement proche, est fixé par liaison covalente à l'extrémité de l'autre bras. Libres en solution, les balises moléculaires ne sont pas fluorescentes. Par contre, lors de l'hybridation avec un brin d'acide nucléique contenant une séquence cible, elles subissent un changement de conformation qui sépare le fluorophore et l'extincteur de fluorescence, ce qui les rend fluorescentes lorsqu'elles sont excitées. L'intensité de la fluorescence pendant un cycle donné, ou après un cycle, dépend de la quantité d'amplicons spécifiques présents à ce moment. L'automate de PCR en temps réel surveille simultanément la fluorescence émise par toutes les balises.

Précautions

- L'utilisation du kit est réservée aux professionnels de laboratoire. Les modes opératoires doivent être suivis de manière à éviter la production d'aérosols lors de la manipulation des échantillons. Il convient d'observer les précautions habituelles et les recommandations en vigueur dans l'établissement lors de la manipulation des échantillons. Une fiche de données de sécurité est disponible auprès de Myconostica Ltd.
- Ce test est réservé au diagnostic *in vitro*.
- Ce test est compatible uniquement avec l'automate Cepheid SmartCycler® et le logiciel de diagnostic Dx versions 1.7b et 3.0.
- Ne pas utiliser les réactifs ni les témoins si les sachets protecteurs sont ouverts ou endommagés à la livraison.
- Les réactifs et les témoins ne sont pas interchangeables d'un lot à un autre.
- Ne jamais mélanger les réactifs ou les témoins provenant de différents tubes, même s'ils sont du même lot.
- Ne jamais utiliser les réactifs ni les témoins au-delà de la date d'expiration.
- Il convient de ne pas recongeler ni réutiliser les réactifs et les témoins après ouverture.
- Porter des vêtements de protection et des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit.
- Éviter la contamination des réactifs par les microbes et la désoxyribonucléase (DNAse) lors du prélèvement des parties aliquotes des tubes.

[9] Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. Med Mycol: 43 (Suppl 1): S147-54.
[10] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. Clin Infect Dis: 37 (Suppl 3): S265-80.
[11] Camuset J, Lavolé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. Rev Pneumol Clin. 63:155-166.
[12] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

- Il est recommandé d'utiliser des embouts pour pipettes stériles, exempts de DNAse et à usage unique de type filtres à faible rétention ou à déplacement direct.
- Utiliser un embout neuf pour chaque échantillon et chaque réactif.
- Mettre au rebut les réactifs inutilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, régionale et locale en vigueur.
- Afin d'éviter la contamination par les amplicons d'*Aspergillus* et de l'IAC, ne pas ouvrir les tubes réactionnels après amplification.
- L'analyse de témoins supplémentaires peut être exigée par les recommandations ou la réglementation nationale, régionale et/ou locale en vigueur ou par l'organisme d'agrément.
- Ne pas manger, boire ni fumer à proximité des zones de manipulation des échantillons et des réactifs.
- L'ADN à faible concentration peut être instable s'il n'est pas conservé correctement. Il est recommandé de conserver l'ADN extrait des échantillons cliniques à -80 °C afin d'en préserver l'intégrité. Dans la mesure du possible, il convient également d'éviter la décongélation et la recongélation répétées.

Contenu du kit

Description

Le kit est constitué de 5 sachets en aluminium, à 3 compartiments, scellés, utilisables individuellement. Chaque sachet contient les quantités nécessaires de réactifs pour réaliser 8 réactions.

		Volume
Tube 1 (bouchon orange)	dNTP $MgCl_2$ Solution tamponnée de complexe d'ADN polymérases	66 µL
Tube 2 (bouchon vert)	< 0,01 % d'amorces < 0,01 % de balises moléculaires < 0,0001 % d'IAC Le contrôle interne d'amplification est un plasmide recombinant contenant une séquence non infectieuse et sans relation avec la séquence cible (*Aspergillus*). Tampon Tris/HCl	66 µL
Tube 3 (bouchon transparent)	Témoin négatif Eau	25 µL
Tube 4 (bouchon noir)	Témoin positif < 0,0001 % d'ADN témoin positif La molécule du témoin positif est un plasmide recombinant contenant la séquence cible d'*Aspergillus*. Tampon Tris/HCl	25 µL

Autres éléments contenus dans le kit :

- CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay™ Aspergillus Myconostica
- Mode d'emploi
- Certificat d'analyse

Conservation

Il convient de conserver le kit au congélateur (de -15 °C à -25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit, date au-delà de laquelle il convient de mettre le kit au rebut conformément à la réglementation locale en vigueur.

Le contenu d'un sachet doit être utilisé immédiatement après ouverture. Ne pas le recongeler ni le réutiliser ultérieurement.

Équipement et matériel nécessaires et non fournis

A. Équipement nécessaire
- Automate de PCR en temps réel SmartCycler® (avec manuel d'utilisation, ordinateur relié et logiciel SmartCycler® Dx version 3.0 ou 1.7b)
- Tubes réactionnels SmartCycler®
- Minicentrifugeuse adaptée aux tubes réactionnels SmartCycler®
- Portoir en plastique pour tubes réactionnels SmartCycler®

B. Équipement nécessaire commun
- Microcentrifugeuse
- Agitateur vortex
- Micropipettes (volumes de 7,5 µL à 20 µL)
- Embouts filtres stériles à faible rétention
- Gants à usage unique, non poudrés
- Solution de décontamination de l'ADN exclusive
- Marqueur permanent
- Kit d'isolement d'ADN (voir ci-dessous)

Échantillon

L'échantillon à soumettre au test MycAssay™ Aspergillus est l'ADN génomique total des échantillons cliniques de LBA et d'autres échantillons des voies respiratoires inférieures. À cette fin, il est recommandé d'utiliser le kit d'isolement et l'équipement suivants, employés pour la validation du test :

- Kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra™ (RÉF. 080-005 disponible auprès de Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, États-Unis)
- Adaptateur vortex (RÉF. 080-015 disponible auprès de Myconostica)

Remarques sur le mode opératoire

- Lire le mode opératoire dans son intégralité avant de commencer.
- La durée totale du mode opératoire du test MycAssay™ Aspergillus (extraction d'ADN exclue) est d'environ 2 heures, selon le nombre d'échantillons analysés.
- Il convient de préparer le test sur un poste de travail pour PCR ou dans un laboratoire pré-PCR. Si aucun poste de travail pour PCR n'est disponible, il convient de préparer le test dans une zone dédiée du laboratoire [13], séparée des zones utilisées pour l'extraction d'ADN et nettoyée régulièrement avec un agent de décontamination de l'ADN.
- Toutefois, les agents de décontamination de l'ADN sont susceptibles d'inhiber la réaction du test. Il faut donc éviter leur utilisation lors de la préparation de la PCR en temps réel.
- Transvaser les liquides au moyen de micropipettes. Il convient d'utiliser des micropipettes dédiées à la préparation des réactions et de les décontaminer régulièrement.
- Il est recommandé d'utiliser des embouts filtres à faible rétention afin d'éviter toute perte d'ADN pendant la phase de préparation.
- **Manipuler le Tube 4 avec précaution. Il contient un témoin positif à base d'ADN qui, en cas de contamination, risque de donner des résultats faussement positifs.**
- Toujours porter des gants.
- Tous les tubes réactionnels doivent être bouchés après utilisation et avant mise au rebut.
- En cas de traitement d'échantillons de plusieurs patients, veiller à identifier les tubes réactionnels SmartCycler® de manière adaptée.
- Faire preuve de vigilance lors de la sélection du fichier du mode opératoire d'analyse. Sélectionner UNIQUEMENT **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** ou **MycAssay Aspergillus v1_3**. Ne pas sélectionner **SERUM MycAssay Asp v1**.

[13] Voir par exemple Miffin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

Mode opératoire

1. Préparation de la PCR en temps réel

1.1 Pour commencer, mettre en marche le système de PCR en temps réel (automate et ordinateur relié) et lancer le logiciel correspondant. Saisir le nom d'utilisateur et le mot de passe.

1.2 Vérifier que le plan de travail a été nettoyé à l'aide d'un agent de décontamination de l'ADN et qu'il est sec. Éviter cependant l'utilisation de tels agents pendant la préparation du test car un excès de solution nettoyante peut inhiber la PCR.

1.3 Un sachet contient un Tube 1, un Tube 2, un Tube 3 et un Tube 4. Chaque sachet contient les quantités nécessaires de réactifs pour réaliser 8 réactions. Pour chaque passage, au moins une réaction avec un témoin positif et une réaction avec un témoin négatif doivent être réalisées avec les réactifs d'un même lot du kit. Un sachet permet ainsi d'analyser 6 échantillons de patient. S'il y a plus de 6 échantillons à analyser, plusieurs sachets peuvent être utilisés, à condition que ceux-ci proviennent du même lot du kit. Les 5 sachets du kit permettent d'analyser un maximum de 38 échantillons de patient.

1.4 Calculer le nombre de réactions requises en se reportant au tableau ci-dessous :

Nombre de sachets	Nombre maximum d'échantillons de patient
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

1.5 Sortir le nombre adapté de sachets du congélateur. Ne pas utiliser un sachet non scellé. En cas de congélation des échantillons de patient après extraction, sortir également ceux-ci du congélateur.

1.6 Ouvrir le nombre nécessaire de sachets en les déchirant et en extraire les tubes. En cas d'utilisation de plusieurs sachets mais d'analyse d'un seul jeu de témoins positif et négatif, les Tubes 3 et 4 ne doivent être retirés que d'un seul sachet. **Manipuler le Tube 4 avec précaution. Il contient un témoin positif à base d'ADN qui, en cas de contamination, risque de donner des résultats faussement positifs.**

1.7 Laisser le contenu des tubes décongeler à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. Vérifier que le contenu de chaque tube est entièrement décongelé avant utilisation. Agiter les tubes et les échantillons de patient au vortex pour en mélanger le contenu puis centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse pour s'assurer qu'il ne reste pas de dépôt au fond des tubes avant utilisation.

1.8 Placer le nombre requis de tubes réactionnels SmartCycler® sur les portoirs. Veiller à toujours saisir les tubes réactionnels par le col.

1.9 Préparer toujours le témoin négatif en premier, suivi des échantillons de patients. Il convient de toujours préparer le témoin positif en dernier.

1.10 Les volumes de réactifs et d'ADN sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Réactif	Réaction		
	Témoin négatif	Échantillon de patient	Témoin positif
Tube 1 (bouchon orange)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tube 2 (bouchon vert)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tube 3 (bouchon transparent)	10 µL	-	-
Échantillon de patient	-	10 µL	-
Tube 4 (bouchon noir)	-	-	10 µL
Volume total	25 µL	25µL	25 µL

1.11 Ajouter les réactifs dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus : Tube 1 suivi du Tube 2 puis de la matrice (témoin négatif, échantillon de patient ou témoin positif). Faire preuve de précaution lors du prélèvement des parties aliquotes du Tube 1 ; le liquide est légèrement visqueux et peut adhérer à la paroi interne du tube. Si c'est le cas, procéder à une nouvelle centrifugation pour recueillir le reste du contenu dans le fond du tube avant de tenter de prélever les dernières parties aliquotes.

1.12 Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque transfert de liquide. Après utilisation, reboucher chaque tube réactionnel et jeter immédiatement le tube et le contenu restant dans un conteneur à déchets cliniques scellable. Il est impossible de conserver les réactifs inutilisés pour un usage ultérieur.

1.13 Faire preuve d'une extrême précaution lors du prélèvement à la pipette dans le Tube 4 (ADN témoin positif) afin de ne pas contaminer d'autres tubes réactionnels. Le bouchage des autres tubes réactionnels avant ouverture du Tube 4 peut réduire le risque de contamination croisée.

1.14 Vérifier que tous les tubes réactionnels sont bien bouchés puis marquer chaque bouchon au marqueur permanent, par exemple avec les mentions POS pour témoin positif, NEG pour témoin négatif et l'identifiant du patient pour les échantillons. Centrifuger les tubes réactionnels pendant 10 s dans la minicentrifugeuse spécialement adaptée. Vérifier par un contrôle visuel l'absence de bulles dans le mélange réactionnel.

1.15 Passer aussitôt à la Section 2. Les réactions du test MycAssay™ Aspergillus restent stables à température ambiante pendant un maximum de 60 minutes.

1.16 Après préparation de la PCR, nettoyer soigneusement le plan de travail à l'aide d'un agent de décontamination de l'ADN.

2. Réalisation de l'analyse

Avant de poursuivre, vérifier la version du logiciel Dx installée sur l'ordinateur. Lancer le logiciel, sélectionner **Help** dans la barre d'outils puis cliquer sur **About.**

Pour la version 1.7b, suivre les consignes de la Section 2.1 ci-dessous.
Pour la version 3.0, suivre les consignes de la Section 2.2 ci-dessous.

Noter également que la récupération d'analyses avec l'option **Retrieve Run(s)** et l'importation de test avec l'option **Import** exigent des droits d'accès particuliers. Seul **l'administrateur** de l'instrument peut assigner ces droits.

2.1 Logiciel de diagnostic SmartCycler® Dx version 1.7b

2.1.1 Démarrer le logiciel de diagnostic SmartCycler® Dx version 1.7b et saisir le nom d'utilisateur et le mot de passe.

2.1.2 Introduire le **CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay™ Aspergillus Myconostica** dans le lecteur puis cliquer sur l'onglet **Define Assays**.

2.1.3 Sélectionner **Retrieve Run(s)** dans le répertoire **Tools** situé dans la barre d'outils supérieure puis cliquer sur **Proceed**.

2.1.4 Sélectionner le fichier **MycAssay Aspergillus Dx1_7bv1_3.DXA** sur le CD-ROM, comme indiqué ci-dessous. Ce fichier doit être l'un des deux fichiers reconnus par le logiciel.

2.1.5 Sur l'écran suivant, mettre en surbrillance le fichier **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** puis cliquer sur **OK**, **Proceed** et à nouveau **OK**.

2.1.6 Fermer le logiciel. À la prochaine ouverture du logiciel, le test **MycAssay Aspergillus Dx1.7b v1.3** pourra être utilisé pour créer une nouvelle analyse.

2.1.7 Cliquer sur l'onglet **Create Run**. Saisir un nom d'analyse dans le champ **Run Name** (il est recommandé d'inclure au moins la date et les initiales de l'opérateur dans le nom) ou laisser le champ vierge afin que le logiciel génère automatiquement un nom.

2.1.8 Sélectionner le test **MycAssay Aspergillus Dx1.7b v1.3**.

2.1.9 Dans les champs **Lot Number** et **Expiration Date**, saisir respectivement le numéro de lot et la date d'expiration du kit tels qu'imprimés sur la boîte du kit et sur chaque sachet. Le numéro de lot est sous la forme M-XXXXXXXX.

2.1.10 Saisir le nombre d'échantillons dans le champ **Number of specimens** puis cliquer sur **Apply**. Le logiciel renseigne automatiquement le champ **Sample-ID** de chaque échantillon avec la mention *SPEC*. Par conséquent, à des fins d'identification, renommer chaque échantillon en double-cliquant sur *SPEC* pour le mettre en surbrillance puis en saisissant un identifiant.
Le logiciel inclut automatiquement un témoin négatif et un témoin positif à l'analyse par PCR en temps réel.

2.1.11 Placer avec précaution les tubes réactionnels sur les emplacements désignés sur le bloc SmartCycler® puis cliquer sur **Start Run**. Remarque : Faire preuve de précaution lors du placement des tubes réactionnels sur les emplacements désignés car ceux-ci peuvent se trouver dans un ordre différent de celui de la préparation. Noter le nom de l'analyse puis cliquer sur **OK**. L'analyse démarre et des voyants rouges s'allument au-dessus de chaque emplacement utilisé du bloc.

2.1.12 Pour déterminer le temps d'analyse, cliquer sur l'onglet **Check Status**. Le nom de l'analyse et le temps restant s'affichent.

2.2 Logiciel de diagnostic SmartCycler® Dx version 3.0

2.2.1 Démarrer le logiciel de diagnostic SmartCycler® Dx version 3.0 et saisir le nom d'utilisateur et le mot de passe.

2.2.2 Introduire le **CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay™ Aspergillus Myconostica** dans le lecteur puis cliquer sur l'onglet **Define Assays** et importer le fichier **MycAssay Aspergillus v1_3.sca** du CD-ROM.

2.2.3 Cliquer sur l'onglet **Create Run**. Saisir un nom d'analyse dans le champ **Run Name** (il est recommandé d'inclure au moins la date et les initiales de l'opérateur dans le nom) ou laisser le champ vierge afin que le logiciel génère automatiquement un nom.

2.2.4 Sélectionner le test **MycAssay Aspergillus v1.3**.

2.2.5 Dans les champs **Lot Number** et **Expiration Date**, saisir respectivement le numéro de lot et la date d'expiration du kit tels qu'imprimés sur la boîte du kit et sur chaque sachet. Le numéro de lot est sous la forme M-XXXXXXXX.

2.2.6 Dans les champs **Patient (Sample) ID** et **Number of specimens**, saisir respectivement l'identifiant du patient (de l'échantillon) et le nombre d'échantillons (réplicats) puis cliquer sur **Apply**. Répéter l'opération pour tous les échantillons de patient à analyser. Le logiciel inclut automatiquement un témoin négatif et un témoin positif à l'analyse par PCR en temps réel.

2.2.7 Placer avec précaution les tubes réactionnels sur les emplacements désignés sur le bloc SmartCycler® puis cliquer sur **Start Run**. Remarque : Faire preuve de précaution lors du placement des tubes réactionnels sur les emplacements désignés car ceux-ci peuvent se trouver dans un ordre différent de celui de la préparation. Noter le nom de l'analyse puis cliquer sur **OK**. L'analyse démarre et des voyants rouges s'allument au-dessus de chaque emplacement utilisé du bloc.

2.2.8 Pour déterminer le temps d'analyse, cliquer sur l'onglet **Check Status**. Le nom de l'analyse et le temps restant s'affichent.

3. Analyse et interprétation des données

3.1 Les résultats peuvent être affichés dans le logiciel Dx en sélectionnant l'onglet **View Results**.

3.2 Cliquer sur le bouton **View Another Run**, en bas de la page, sélectionner l'analyse à afficher puis cliquer sur **OK**.

3.3 L'option **Patient Results** doit déjà être sélectionnée dans la liste **Views**. L'identifiant du patient (de l'échantillon) et les résultats du test sont clairement énumérés. Les résultats peuvent être interprétés à l'aide du tableau ci-dessous :

Résultat	Résultat patient	Couleur	Interprétation	Action nécessaire
1	Negative	Vert	Négatif pour *Aspergillus*	Mentionner les résultats dans le rapport.
2	Positive	Rouge	Positif pour *Aspergillus*	Mentionner les résultats dans le rapport.
3	Invalid	Gris clair*	Échec de l'IAC dans l'échantillon	Répéter l'analyse de l'échantillon.
4	Invalid	Gris clair*	Échec du témoin positif ou du témoin négatif	Répéter toute l'analyse.

*Le résultat ND, en gris clair, correspond au code d'erreur 3079. Il est dû à une forte fluorescence dans une ou plusieurs voies. Si une valeur de Ct ≤ 36,0 est enregistrée dans la voie *Aspergillus*, mentionner ce résultat comme positif dans le rapport.

3.4 Pour afficher les résultats des échantillons individuels séparément pour *Aspergillus* ou l'IAC, sélectionner **Sample Results** dans la liste **Views** puis cliquer sur les onglets de chacune des cibles. Les résultats s'affichent dans le même format que pour l'option **Patient Results** mais concerne chaque cible.

3.5 Si un échantillon de patient présente un résultat invalide, celui-ci est dû à l'échec de l'IAC (indiqué par la mention Unresolved dans l'onglet **Sample Results**). Dans ce cas, répéter la réaction ainsi que l'analyse des témoins positif et négatif. Si la réaction échoue à nouveau, il se peut que la matrice contienne une substance inhibitrice et que le résultat négatif ne soit pas fiable.

3.6 Pour exporter les données d'analyse vers un autre ordinateur, sélectionner **Data Management** dans le répertoire **Tools**, en haut de l'écran puis, dans le menu déroulant, sélectionner **Archive Run(s)**. Un message s'affiche. Cliquer sur **Proceed**. Sélectionner l'analyse à archiver en cochant la case de gauche puis cliquer sur **OK**. Un message d'avertissement indiquant le nombre d'analyses à archiver s'affiche. Si ce nombre est correct, cliquer sur **Proceed**. Sélectionner un emplacement d'enregistrement du fichier d'analyse, par exemple une clé USB. Cliquer sur **Save** et noter le nom du fichier. Un message indiquant le nombre d'analyses à archiver s'affiche. Si ce nombre est correct, cliquer sur **Proceed**.

3.7 Pour importer les données d'analyse, sélectionner **Data Management** dans le répertoire **Tools**, en haut de l'écran puis, dans le menu déroulant, sélectionner **Retrieve Run(s)**. Un message s'affiche. Cliquer sur **Proceed**. Dans le menu déroulant **Look in:** sélectionner le périphérique de stockage utilisé pour archiver les données d'analyse (voir la section 3.4 ci-dessus). Sélectionner le fichier d'analyse à récupérer puis cliquer sur **Open**. Un nouvel écran invite l'utilisateur à sélectionner l'analyse à récupérer. Sélectionner l'analyse à récupérer puis cliquer sur **OK**. Un message indiquant le nombre d'analyses à récupérer s'affiche. Si ce nombre est correct, cliquer sur **Proceed**.

3.8 Si une copie papier des résultats est également souhaitée, cliquer sur **Report** puis sur **Print**.

4. Dépannage

4.1 Le témoin négatif a émis un signal positif dans la voie FAM :

- Une contamination s'est produite pendant la préparation. Aucun des résultats de l'analyse n'est fiable.

→ Répéter toute l'analyse en faisant preuve de précaution lors de l'ajout des matrices, en particulier du témoin positif (Tube 4) pour éviter toute contamination croisée.

→ Veiller à ce que le plan de travail et l'équipement soient bien décontaminés avant et après utilisation.

- Le témoin négatif a été mal positionné sur l'automate.

→ Veiller à placer les tubes réactionnels aux emplacements désignés.

4.2 La valeur Ct de l'IAC du témoin négatif ne se trouve pas dans la plage acceptable :

- La PCR a été inhibée.

→ Vérifier que le plan de travail et l'équipement soient complètement secs après nettoyage avec un agent de décontamination et avant préparation de la PCR.

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section «Conservation» du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- Le réactif du Tube 1 ou du Tube 2 n'a pas été ajouté au mélange réactionnel pour PCR ou deux fois trop de réactif du Tube 2 a été ajouté.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide d'un tube réactionnel est plus élevé ou plus bas que celui des autres tubes.

4.3 Le témoin positif donne un résultat négatif :

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section «Conservation» du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- Une erreur s'est produite à l'étape 1.12 et la matrice du témoin positif (Tube 4) a été placée dans le mauvais tube réactionnel.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide d'un tube réactionnel est plus élevé que celui d'un autre.

- Le réactif du Tube 1 ou du Tube 2 n'a pas été ajouté au mélange réactionnel.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide de ce tube réactionnel est plus bas que celui des autres tubes.

- Le témoin positif a été mal positionné sur l'automate.

→ Veiller à placer les tubes réactionnels aux emplacements désignés.

4.4 Les échantillons de patient donnent le Résultat 3 « Invalid » :

- Il est probable que les échantillons cliniques extraits contiennent des inhibiteurs de la PCR.

→ Il est recommandé d'extraire l'ADN des échantillons cliniques à l'aide du kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra™.

4.5 Aucune voie ne donne de résultat pour aucun des échantillons ni des témoins :

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section «Conservation» du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- L'automate ne fonctionne pas de façon optimale.

→ Vérifier que l'entretien et l'étalonnage de l'automate de PCR en temps réel sont à jour, conformément aux instructions du guide d'installation et de maintenance.

- La configuration du logiciel a été faite avec un fichier de mode opératoire incorrect.

→ Se reporter à la Section 2 et sélectionner le fichier de mode opératoire correct sur le CD-ROM de mode opératoire Myconostica, tel qu'indiqué pour chaque version du logiciel. Seul le fichier compatible avec le logiciel peut être chargé. Répéter l'analyse avec le fichier de mode opératoire correct.

Pour toute question ou en cas de problème, contacter le Service d'assistance technique (productsupport@lab21.com).

Caractéristiques de performance et limites

Sensibilité analytique

À partir du mode opératoire décrit ci-dessus et des cibles de PCR générées par Myconostica, la limite du blanc déterminée pour le test MycAssay™ Aspergillus correspond à Ct = 38,0 tandis que le seuil de détection est < 50 copies de l'ADN cible. Ces valeurs ont été déterminées avec la souche AF293 d'*Aspergillus fumigatus* dont le génome a été entièrement séquencé. Il a été démontré par cartographie optique[14] que le génome contient 37 copies de la cible. Ainsi, 50 copies de la cible représentent environ 1,3 génomes.

Spécificité et sélectivité analytiques

La spécificité analytique a été évaluée à l'aide d'ADN extrait de 15 espèces d'*Aspergillus* dont plusieurs souches d'*A. fumigatus*, d'*A. niger*, d'*A. terreus* et d'*A. nidulans*. Les signaux détectés au-delà de la limite du blanc ont été enregistrés comme résultats positifs.

Les 15 espèces d'*Aspergillus* spp. ont donné un résultat positif avec ce test. Outre les espèces mentionnées ci-dessus, les espèces suivantes ont été testées : *A. flavus, A. versicolor, A. glaucus, A. sclerotiorum, A. niveus, A. lentulus, A. unguis, A. candidus, A. wentii, A. tubingensis* et *A. foetidus*.

L'ADN génomique extrait de *Pénicillium* spp. a également donné des résultats positifs. Cela s'explique par le fait que les séquences des cibles moléculaires sont très similaires entre *Aspergillus* et *Pénicillium*. Par conséquent, il est à noter qu'un résultat positif avec ce test peut provenir d'une infection à *Pénicillium* plutôt qu'une infection à *Aspergillus*.

La sélectivité analytique a été évaluée à l'aide d'ADN extrait de diverses espèces fongiques et non fongiques. Les espèces suivantes n'ont pas donné de résultat positif :
Alternaria alternata, Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, Cladosporium spp., Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis jirovecii, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum. Les espèces bactériennes suivantes n'ont pas donné de résultat positif : *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius.*

L'ADN du génome humain ne donne pas de résultat positif avec ce test.

Reproductibilité et répétabilité

La répétabilité et la reproductibilité du test ont été déterminées par cinq opérateurs qui ont analysé en aveugle un ensemble de sept matrices en trois exemplaires chacune. Les expériences ont été menées sur trois lots de fabrication du kit MycAssay™ Aspergillus, sur trois automates situés sur deux sites au Royaume-Uni.

Les résultats ont été comparés à la limite du blanc et à la valeur limite clinique. À une concentration égale à trois fois le seuil de détection, 100 % des échantillons ont donné des résultats conformes à la limite du blanc (résultats positifs) et 91% des échantillons ont donné des résultats conformes à la valeur limite clinique. À des concentrations supérieures à trois fois le seuil de détection, 100 % des échantillons présentaient des résultats conformes à la valeur limite clinique et à la limite du blanc. Dans le cas des matrices négatives, tous les échantillons analysés ont donné un résultat négatif à la valeur limite clinique.

Substances interférentes (contre-indications)

Les composés suivants ont été analysés à des concentrations pertinentes du point de vue clinique et déterminés comme non inhibiteurs du test : acétylcystéine, amphotéricine, dipropionate de béclométasone, budésonide, colistiméthate sodique, propionate de fluticasone, fumarate de formotérol dihydraté, bromure d'ipratropium, lidocaïne, mannitol, sulfate de salbutamol, salmétérol, chlorure de sodium, cromoglicate de sodium, terbutaline, tobramycine.

[14] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigates.* Nature: 438: 1151-6.

Évaluation des performances

Des échantillons respiratoires (LBA) prélevés dans deux hôpitaux, dont l'ADN a été extrait avec le kit MycXtra™ puis qui ont été congelés, ont servi à évaluer les performances du kit MycAssay™ Aspergillus avec les échantillons cliniques. Les résultats ont été comparés à la fois au diagnostic clinique et à la culture.

La valeur limite de Ct = 36,0 a été déterminée suite au passage en revue d'un ensemble de données d'échantillons issus de différents sites et prélevés sur différentes populations de patients. La probabilité de différenciation entre la maladie et l'état sain a été évaluée avec plusieurs valeurs limites.

Comparaison entre la PCR et le diagnostic clinique

	Diagnostic clinique positif	Diagnostic clinique négatif		
PCR positive	31	1	0,97	VPP
PCR négative	2	10	0,83	VPN
	0,94	0,91		
	Sensibilité	Spécificité		

Comparaison entre la PCR et la culture d'*Aspergillus*

	Culture positive	Culture négative		
PCR positive	29	3	0,91	VPP
PCR négative	2	10	0,83	VPN
	0,94	0,77		
	Sensibilité	Spécificité		

Parmi les échantillons analysés, 0,8 % contiennent des inhibiteurs de la PCR suite à l'extraction à l'aide du kit MycXtra™, comme indiqué par l'IAC.

Rapport clinique

REMARQUE : Lors de l'examen du rapport des résultats, vérifier que le bon mode opératoire a été suivi. Pour les échantillons respiratoires, il est impératif d'utiliser MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3 ou MycAssay Aspergillus v1_3. Le mode opératoire SERUM MycAssay Asp v1 est réservé au kit MycAssay Aspergillus SmartCycler Serum IFU (Réf. 030-169). L'utilisation d'un mode opératoire inadapté peut invalider les résultats.

Le kit MycAssay™ Aspergillus est destiné à servir d'aide au diagnostic. Les résultats doivent être considérés dans le contexte de l'état clinique du patient et en association avec les résultats d'autres tests de diagnostic.

Il est recommandé d'employer la phraséologie suivante dans le rapport, en fonction de l'interprétation des résultats du test.

Résultat 1
« *Aspergillus* spp. non détecté. »

Résultat 2
« *Aspergillus* spp. détecté. Résultat positif. Ce test est également susceptible de détecter *Pénicillium* spp. »

Résultat 3
« Échec du test, présence d'inhibiteurs ou d'une autre substance inconnue. »

Limites du mode opératoire

- La principale limite de ce mode opératoire est liée à la qualité de l'échantillon primaire.
  - Si l'échantillon est très petit ou n'a pas été prélevé dans la zone affectée du poumon, le test peut se révéler moins sensible et donner un résultat faussement négatif.
  - Il convient de centrifuger les échantillons de LBA avant extraction de l'ADN du culot.

- Les données ont également montré qu'une diminution, lors de l'étape de centrifugation, du volume de surnageant utilisé pour l'extraction réduit la proportion d'inhibiteurs pénétrant dans le système.

- Il est possible d'obtenir des résultats faussement positifs si l'agent infectieux est *Pénicillium* spp. car celui-ci ne peut pas être différencié d'*Aspergillus* spp. avec ce kit.

- Bien que le procédé d'extraction d'ADN fongique MycXtra™ soit conçu pour éliminer les inhibiteurs de la PCR, tous les médicaments et toutes les populations de patients n'ont pas été évalués.

- Ce mode opératoire n'a pas été évalué de manière approfondie sur les expectorations et n'a pas non plus été évalué sur les échantillons provoqués dans le sérum physiologique ni sur des échantillons prélevés sur des enfants.

- Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus en cas de contamination externe de l'échantillon initial ou du test, par exemple par de l'air contenant de l'*Aspergillus*, par une mauvaise technique de manipulation du témoin positif ou par contamination externe (en particulier de la pipette) par l'ADN d'*Aspergillus*.

- Dans la mesure où un résultat vraiment positif peut être obtenu avec des échantillons de patients colonisés temporairement ou en permanence par *Aspergillus* spp., le résultat du test doit être interprété cliniquement dans le contexte de la maladie.

LICENCE

TopTaq™ Hot Start est fourni par QIAGEN. QIAGEN® est une marque déposée de Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne.

Ce produit est vendu sous licence par le Public Health Research Institute (PHRI), Newark, New Jersey, États-Unis et il est sous protection de la propriété intellectuelle du PHRI. Son utilisation se limite au diagnostic humain *in vitro*.

SmartCycler® est une marque déposée de Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, Californie, 94089, États-Unis.

Une partie de ce produit est soumis à une autorisation exclusive d'exploitation de brevet en instance, détenu par le Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, États-Unis.

IVD

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882 Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE